

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

## 12 PATENTSCHRIFT A5

21 Gesuchsnummer: 902/90

22 Anmeldungsdatum: 23.06.1989

30 Priorität(en): 11.07.1988 US 217299

24 Patent erteilt: 15.04.1993

45 Patentschrift  
veröffentlicht: 15.04.199373 Inhaber:  
Purdue Research Foundation, West Lafayette/IN  
(US)72 Erfinder:  
Badyak, Stephen F., West Lafayette/IN (US)  
Lantz, Gary C., Lafayette/IN (US)  
Geddes, Leslie A., West Lafayette/IN (US)  
Cofley, Arthur C., Indianapolis/IN (US)74 Vertreter:  
E. Blum & Co., Zürich

86 Internationale Anmeldung: PCT/US 89/02776 (En)

87 Internationale Veröffentlichung: WO 90/00395 (En)  
25.01.1990

## 54 Gewebetransplantat.

57 Es wird ein Gewebetransplantat aus einem Segment des Dünndarmes insbesondere von warmblütigen Vertebraten beschrieben. Das Gewebetransplantat umfasst die Tunica submucosa aus einem Dünndarmsegment eines warmblütigen Vertebraten, wobei die Tunica submucosa abgetrennt ist von der Tunica muscularis und mindestens vom luminalen Teil der Tunica mucosa. Es wird gezeigt, dass das Gewebetransplantat ausgezeichnete mechanische Charakteristiken besitzt, aber auch ebenso gute nicht-allergene und nicht-thrombogene Eigenschaften aufweist, bei Anwendungen als Gefäss-Autotransplantat, Gefäss-Alлотransplantat und Gefäss-Heterotransplantat.

BEST AVAILABLE COPY



## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein neues Gewebetransplantat, das durch Stärke, Durchlässigkeit, Infektionsresistenz, nicht-immunogene und nichtthrombogene Eigenschaften ausgezeichnet ist. Zudem besitzt es eine ausgesprochene Resistenz gegen Aneurysmen, welche diejenige von vielen synthetischen Transplantationsmaterialien übertrifft. Im besonderen befasst sich diese Erfindung mit Gewebetransplantaten, die aus der submucosalen und basilar-mucosalen Teilen des Dünndarms aufgebaut sind.

Gewebematerialien für die Gefäßstransplantation besitzen heute eine grosse klinische und wirtschaftliche Bedeutung. Es wird geschätzt, dass 1986 etwa 130 Millionen Dollar für Gefässrekonstruktionen mit Ersatzgewebe ausgegeben wurden, wobei in dieser Zahl die Kosten für koronare Bypass-Arterien nicht berücksichtigt sind. Die Erfolgsaussichten bei Gefässrekonstruktionen sind immer noch viel schlechter, als bei anderen Operationen. Zum Beispiel wird eine 5jährige kumulative Durchlässigkeit von 50% als hervorragend eingestuft, bei einer Transplantation von Gefässen mit kleinem Durchmesser. Die niedrigen Erfolgsaussichten rühren zum grössten Teil von einem oder mehreren physikalischen oder funktionellen Mängel im Gewebematerial her, das heute in der Klinik gebraucht wird.

Die Identifikation von nützlichen Materialien für den Gewebeersatz gestaltet sich besonders schwierig, weil diese Materialien verschiedene Eigenschaften gleichzeitig besitzen müssen. Zum Beispiel muss das Gefässersatzmaterial hohe mechanische Stabilität unter kontinuierlicher Beanspruchung aufweisen, daneben muss es eine der Kapillarisation angepasste Porosität besitzen, die Dehnbarkeit muss ähnlich dem umliegenden Gewebe sein und es muss ein hohes negatives Zetapotential aufweisen (für die nicht-thrombogenen Eigenschaften notwendig). Im weiteren darf das Transplantat nicht als Karzinogen noch als Allergen wirken und muss kostengünstig produziert werden können.

Es gibt heute praktisch keinen Gefässersatz, der alle diese gewünschten Eigenschaften besitzt. Literaturberichte über Forschung und Entwicklung auf dem Gebiete der Gefässrekonstruktion berichten denn auch über bedeutende Anstrengungen, um die bekannten Nachteile der heutigen Gewebeersatzmaterialien zu überwinden.

Sowohl synthetische als auch natürliche (autogene) Materialien sind heute im Gebrauch. Unter den synthetischen Materialien ist gestrecktes Polytetrafluorethylen (PTFE) ein häufig gebrauchtes Ersatzmaterial für Gefässstücke, speziell bei Bypass-Operationen an kleinen Gefässen. Bei PTFE-Gefässen besteht jedoch die Gefahr für neointimale Hyperplasien und späten Gefäss thrombosen (z.B. 6jährige Durchlässigkeitsrate für etwa 50% bei femoropoplitealem Bypass). In der venösen Zirkulation besitzen PTFE-Gefässstücke eine noch niedrigere Erfolgschance.

Ein anderes synthetisches Material - Dacron® -

wird häufig für Gefässrekonstruktionen bei grösseren Gefässen verwendet (z.B. infrarenal Aorta). Gewirktes Dacron® besitzt jedoch eine relativ hohe Porosität und muss daher vor der Implantation geglättet werden, um Blutungen zu verhindern. Diese Vorbehandlung ist nicht immer praktikierbar oder erfolgreich. Gewobenes Dacron® ist weniger porös, besitzt aber eine Dehnbarkeit von nur 20% der natürlichen Aorta. Im weiteren eignen sich Dacron®-Gefässersatzmaterialien schlecht für den Einsatz bei Arterien und Venen mit kleinem Durchmesser, wo nur ein kleiner Blutfluss stattfindet.

Ein schwerwiegenderes Problem im Zusammenhang mit dem Einsatz von synthetischen Materialien als Gewebeersatz ist ihre tiefe Infektionsresistenz. Auftretende Infektionen nach einer Gefässimplantation führen zu einer Sterberate von 66 Prozent. Die synthetischen Materialien besitzen die Tendenz, Mikroorganismen in den Gewebespalten festzuhalten. Die Mikroben lassen sich dann nur schwer mit Antibiotika bekämpfen, was fast immer zu einer Explantation des künstlichen Gefässstückes führt.

Neuerdings haben Forscher über Präparationen von synthetischer Haut und Blutgefässen aus lebenden menschlichen Zellen berichtet. Vergleiche dazu die U.S.-Patente 4 604 346; 4 546 500; 4 539 716; 4 485 097 und 4 485 096.

Unter den autogenen Materialien wurden bisher Stücke aus der Vena saphena, der menschlichen Vena umbilicalis, dem Dünndarm und der Arteria radialis verwendet. Die natürlichen Materialien besitzen aber alle auch ihre signifikanten Nachteile. Die Vena saphena kann sich aufgrund ihrer Masse für gewisse Prozeduren nicht eignen oder kann krankhaft verändert sein, so dass sie nicht als Gefässersatz infrage kommt. Zusätzlich kann die Vena saphena eine beschleunigte Atherogenese nach erfolgter «Arteriolisation» aufweisen. Das umbilicate Gefässersatzstück sowie dasjenige aus dem Dünndarm bieten Probleme durch frühe Thrombosis und spätere Ausbuchtungsgefahr (Aneurysmen). Auch der Einsatz der Arteria radialis ist begrenzt, einerseits weil es schwierig ist, Gefässstücke aus ihr zu gewinnen, andererseits wegen der grossen Abnutzungsgefahr nach erfolgter Implantation.

Die hier beschriebene Erfindung ermöglicht die Bereitstellung eines Gewebetransplantates, welches viele der Nachteile von vielen heute in der Klinik verwendeten Gewebematerialien nicht aufweist.

Fig. 1 zeigt einen Querschnitt durch einen Bereich des Dünndarms.

Die Erfindung zielt auf eine Gewebetransplantat-Zusammensetzung ab, welche primär die Tunica submucosa eines Segmentes des Dünndarmes von warmblütigen Vertebraten enthält. Die Tunica submucosa ist abgeschält von der Tunica muscularis und mindestens des luminalen Teils der Tunica mucosa des Dünndarmabschnitts. Das vorliegende Gewebetransplantat hat, wie bereits gezeigt werden konnte, hervorragende funktionelle Eigenschaften in Gefässanwendungen als Auto- und Allotransplantat. Es ist vor auszusehen, dass die Gewebetransplantatzusammensetzung dieser Erfindung

breite Anwendung auch als Heterotransplantat in Gefäss- und anderen Geweberekonstruktionen finden wird. Es wurde nachgewiesen, dass die hier beschriebene Zusammensetzung des Gewebetransplantats vielseitige physikalische und biologische Eigenschaften aufweist, welche besonders attraktiv für Gewebetransplantationen sind.

In einer bevorzugten Verkörperung dieser Erfindung umfasst das Transplantatmaterial Submucosa- und Basalmucosa-Gewebe aus einem Segment des Dünndarmes, bevorzugt dem Jejunum, einem Abschnitt des Dünndarmes zwischen dem Duodenum und dem Ileum. Der Dünndarm ist aus verschiedenen, diskreten Schichten aufgebaut, bevor er gemäss den Methoden dieser Erfindung manipuliert wird. Fig. 1 zeigt einen Querschnitt durch den Dünndarm mit seinen Gewebeschichten A bis G (von aussen nach Innen), welche zusammen die Darmwand bilden. Die äusserste Schicht A bildet das mesenterische Gewebe, welches aus illustrativen Gründen als klar abgegrenzte Schicht gezeigt ist. Normalerweise besitzen diese Gewebe nicht eine diskrete Schichtstruktur, sondern erscheinen als diskontinuierliche Gewebesegmente. Schicht B und C zeigen schematisch die Tunica serosa bzw. die Tunica muscularis. Die Tunica submucosa (Schicht D) ist ein dichtes, irregulär kollagenes Verbindungsgewebe und oft mit vielen Mastzellen durchsetzt. Vermutlich ist das Heparin dieser Mastzellen mindestens teilweise verantwortlich für die fehlende Thrombogenizität dieses Transplantationsgewebes.

Die Schichten E, F und G bilden zusammen die sogenannte Tunica mucosa. Schicht E ist eine Schicht glatter Muskelzellen, welche als Lamina muscularis mucosa bezeichnet wird. Schicht F, das Stratum compactum, besteht aus nichtzellärem Kollagen und Elastin-Fasern. Schicht G besteht aus der Lamina epithelialis mucosa, mit seiner Lamina propria, welche zottenförmige Ausbuchtungen in der Mucosamembran bildet.

Die untenstehend detailliert beschriebene Methode für die Präparation des Transplantationsgewebes ermöglicht, wie histologische Prüfungen zeigen, die Entfernung der Lamina epithelialis mucosa mit seiner Lamina propria wie auch der Tunica muscularis und der Tunica serosa. Das bevorzugte Transplantatgewebe bildet so die Tunica submucosa (D), zusammen mit den basalen Teilen der Tunica mucosa, besonders der Lamina muscularis mucosa (E) und dem Stratum compactum (F). Diese Schichten (D-F) werden im folgenden als die Dünndarm-Submucosa («SIS») bezeichnet.

Ein SIS-Autotransplantat gemäss dieser Erfindung kann beispielsweise durch Herausschneiden eines autogenen Segmentes des proximalen Jejunum mittels eines laparotomischen Schnittes hergestellt werden. Das herausgeschnittene Jejunum-Segment wird dann in einen chirurgischen Schwamm eingehüllt, welcher mit physiologischer Kochsalzlösung getränkt ist. Nach erfolgter intestinaler Anastomosis wird das herausgeschnittene Darmsegment gemäss der unten beschriebenen Methode präpariert, um als Material für die Gewebetransplantation Verwendung zu finden. Allografts werden ent-

sprechend aus Darmgewebe von Spenderorganen/-gewebe der gleichen Spezies präpariert. Heterotransplantate können zum Beispiel aus Darmgewebe von Katzen, Schweinen oder Rindern gewonnen werden, welche im Schlachthof operiert werden. Bis heute sind nur minimale Differenzen in der Morphologie der Darmgewebe aus den verschiedenen Tieren gefunden worden. So ist zum Beispiel das histologische Erscheinungsbild von menschlichem Transplantationsgewebe gemäss dieser Erfindung fast identisch zu demjenigen des Hundes. Der einzige morphologisch erkennbare Unterschied liegt in einem etwas weniger dichten Stratum compactum des menschlichen Gewebes.

Das Transplantationsgewebe dieser Erfindung wird durch Abreiben der äusseren Schichten des Darmsegmentes, der Tunica serosa und der Tunica muscularis (Schicht B und C in Fig. 1), und der inneren Schichten, zumindest des luminalen Teiles (G) der Tunica mucosa (Schichten E bis G in Fig. 1), erhalten. Unter milden Abreibbedingungen wird die Tunica mucosa zwischen dem Stratum compactum (F) und der Lamina propria (G) geschält. Nachdem das mesenterische Gewebe von dem Darmsegment entfernt wurde, z.B. mittels Adson-Brown-Pinzetten und Metzenbaum-Scheren, werden die Tunica serosa und die Tunica muscularis (die äusseren Gewebeschichten) abgeschält. Dazu führt man mit einem Skalpell und einer feuchten Gaze longitudinale Gleitbewegungen aus. Der luminal Teil der Tunica mucosa wird ebenfalls mit Gleitbewegungen abgeschält, nachdem das Darmsegment invertiert wurde. Dabei muss man spezielle Vorsicht walten lassen, um eine Perforation der Submucosa zu verhüten. Daraufhin werden von der Oberfläche alle noch verbleibenden Geweberesten der abgeschälten Schichten sorgfältig entfernt. Wahlweise kann das Darmsegment auch zuerst invertiert werden, um die luminal Schicht zu entfernen. In einem zweiten Schritt wird die ursprüngliche Orientierung wieder hergestellt, damit die Tunica serosa und die Tunica muscularis entfernt werden können. Das Transplantationsgewebe bildet einen weisslich, lichtdurchlässigen Tubus mit einer Wandstärke von etwa 0,1 mm. Er ist typischerweise aus der Tunica submucosa mit der angrenzenden Lamina muscularis mucosa und dem Stratum compactum aufgebaut. Um als Gefässersatz zu dienen, wird der Tubus in die ursprüngliche Orientierung gebracht, so dass das Stratum compactum als die luminal Oberfläche des Transplantates dient.

Das fertig präparierte Transplantatgewebe wird mit Salzlösung gespült und für etwa 20 Minuten in 10%ige Neomycin-Sulfat-Lösung gelegt, um nachher einsatzbereit zu sein. Das Transplantat kann in den üblichen chirurgischen Verfahren für Gefässkonstruktionen Verwendung finden. Für nicht-vasculäre Gewebetransplantationen kann das tubuläre Transplantat längsweg aufgeschnitten und ausgerollt werden; es bildet so ein «Gewebe flickstück». Das gesamte oben beschriebene Präparationsverfahren kann auch direkt an längsweg aufgeschnittenen und ausgerollten Dünndarmstücken angewendet werden. Die so präparierten Gewebetransplantate können z.B. als Gewebe für Haut-

transplantationen oder die Wiederherstellung von anderen Gewebedefekten dienen.

Für den Einsatz als Gefässersatz sollte der Durchmesser des Transplantats ungefähr gleich gross sein wie das Blutgefäss des Empfängers. Durch Manipulationen am Gewebetransplantat kann dieses die Form eines Zylinders mit dem gewünschten Durchmesser annehmen und durch Nähen oder anderes Sichern entlang der Achse ein Gefässstück bilden. So kann z.B. ein Gefässtransplantat präpariert werden, indem man einen sterilen Glasstab mit dem gewünschten Durchmesser wählt und ihn in das Transplantat-Lumen einführt. Das redundante Gewebe wird gesammelt und der gewünschte Gefässdurchmesser erhält man durch Nähen entlang der Längsachse (z.B. mit zwei kontinuierlichen Nähten oder einer einfachen unterbrochenen Naht) oder mit Hilfe einer anderen Gewebesicherungs-methode.

Die SIS-Zusammensetzung besitzt mechanische Eigenschaften, wie sie für Gewebeersatzmaterialien hoch erwünscht sind; z.B. ein kleiner Porositätsindex, eine hohe Dehnbarkeit und einen hohen Bruchdruckpunkt. Experten wissen, dass für das Gewebetransplantat eine genügend tiefe Porosität nötig ist, um intraoperative Blutungen zu verhindern. Andererseits muss die Porosität genügend gross sein, um die Ausdehnung eines sich entwickelnden Vasa vasorum durch das Transplantat zu erlauben, um die Neointima und die lumenale Oberfläche zu ernähren. Die Porosität des Gewebeersatzmaterials wird typischerweise in ml Wasser gemessen, welches pro  $\text{cm}^2/\text{min}$  bei einem Druck von 120 mm Hg die Gefässwand passieren kann. Das SIS-Transplantatgewebe besitzt einen Porositätsindex von 10, ein Wert, der viel tiefer liegt als der von anderen Gewebeersatzmaterialien (z.B. besitzt gewobenes Dacron® einen Porositätsindex von 50). Trotz diesem tiefen Porositätsindex ist SIS immer noch genügend durchlässig, um eine Neokapillarisation innerhalb des SIS-Transplantats zu ermöglichen. Bei Gefässrekonstruktionen mit SIS-Gewebeersatzmaterial können sich blutgefüllte Kapillaren innerhalb der Transplantatwand bis zur luminalen Oberfläche bereits schon vier Tage nach der Operation bilden.

Zwischen der Dehnbarkeit und der Durchlässigkeit von Gefässtransplantaten besteht erfahrungsgemäss ein enger Zusammenhang. Im Idealfall entspricht die Dehnbarkeit des Transplantatmaterials derjenigen des zu ersetzenden Gewebes. Die longitudinale Dehnbarkeit des SIS-Transplantatmaterials wurde in einem einfachen Zugtest gemessen. Die anfängliche Länge wurde mit zwei Farbzeichen auf 5,0 cm festgelegt. Die Dehnung und die angelegte Kraft wurden gemessen, während die Probe mit einer Spannungsrate von 32  $\text{cm}/\text{cm}/\text{min}$  belastet wurde. Die folgenden Resultate wurden erzielt:

Dehnbarkeit des SIS-Transplantats: 0,045  $\text{cm}/\text{N}$  pro cm Länge

Dehnbarkeit von normaler Hunde-Aorta: 0,017  $\text{cm}/\text{N}$  pro cm Länge

Somit besitzt das SIS-Transplantatmaterial sogar eine grössere Dehnbarkeit als die normale Aorta.

Dies ist ein bedeutender Fortschritt über den bisherigen Stand der Technik auf dem Gebiet der Gefäss-transplantation. Alle heute im Einsatz stehenden synthetischen Transplantate sind 3- bis 10mal weniger dehnbar als die natürliche Aorta und entsprechend anfälliger auf Thrombosenbildung als die natürliche Aorta. Bisher kompensierte man diese unterschiedlichen Dehnungseigenschaften dadurch, dass die lichte Weite des Transplantatmaterials grösser gewählt wurde als die der zu verbindenden Arterie. Diese Technik führte jedoch zu zusätzlichen Problemen. Da die Blutflussgeschwindigkeit im weiten Transplantatsegment kleiner ist, bilden sich auch kleinere Schubspannungen an der Transplantatwand aus. Unter solchen Bedingungen besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Plättchen- und Fibrinablagerungen und entsprechend eine erhöhte Gefahr für eine Thrombosenbildung. Im Gegensatz dazu können aufgrund der hohen Dehnbarkeit des SIS-Transplantatmaterials isodiametrische SIS-Gefässstücke eingesetzt und damit die obigen Probleme vermieden werden.

Das heutige SIS-Transplantationsgewebe besitzt einen Bruchdruckpunkt, der weit über der physiologischen Beanspruchung liegt. Zur Messung des Bruchdruckes wird ein tubuläres SIS-Transplantatsegment an zwei Zylindern von je 25 mm Durchmesser befestigt und mit Stickstoffgas von konstanter Flussgeschwindigkeit unter Druck gesetzt. Die Messung erfolgte bei zwei Flussgeschwindigkeiten. Bei der tieferen Durchströmungsrate nahm der Druck anfänglich zu, fiel dann ab und wurde schliesslich konstant, als der Gasausstrom durch die Transplantatwand in ein Gleichgewicht mit dem Gaseinstrom trat. Bei der höheren Durchflussgeschwindigkeit erfolgte der Druckaufbau sofort bis zum Bruch bei etwa 400 mm Hg. Diese Experimente zeigen eindeutig, dass das Transplantatmaterial ohne weiteres dem kontinuierlich pulsierenden Druck unter normalen physiologischen Bedingungen widerstehen kann.

## BEISPIELE

### Beispiel 1:

#### Die Dünndarm-Submucosa als ein arterielles Transplantat mit grossem Durchmesser.

In einer Serie von Experimenten wurde die Fähigkeit von drei verschiedenen Anordnungen des Dünndarmes getestet, um als Gefässtransplantat in der Aorta infrarenals des Hundes zu dienen. Im ersten Experiment wurde ein nichtinverliertes Segment des Jejunum mit voller Dicke eingesetzt, entweder mit einer intakten mesenterischen neurovasculären Versorgung oder mit einem freien, isolierten Segment als Transplantatgewebe. Die Darmmucosa bildete dabei die Blut-Transplantat-Berührungsfläche. Alle vier Hunde starben in diesem Experiment innerhalb 18 Stunden nach der Operation an Thrombosenbildung im Transplantat und an Blutungen an den Nahtstellen.

Im zweiten Experiment diente ein isoliertes und Inverliertes Jejunum-Segment als Transplantat, wo-

bei die Tunica serosa die Blut-Transplantat Berührungsfläche bildete. Es wurden zwei Hunde getestet. Das Transplantat im ersten Hund war innerhalb vier Stunden nach erfolgter Operation durch eine Thrombose undurchlässig und der zweite Hund starb vier Tage nach der Operation an akuten Blutungen an der proximalen Anastomosis-Stelle.

Im dritten Experiment wurde nur ein Teil der Dünndarmwand als Transplantat verwendet. Dazu wurde von jedem Hund ein freies Segment von autogenem oberem Jejunum gewonnen. Der grösste Teil der Mucosa wurde daraufhin durch blosses Abschaben der luminalen Oberfläche mit einem Skalpell entfernt. Mittels der selben Prozedur wurde daraufhin die Serosa und die Tunica muscularis entfernt. Das nach dieser rauen Manipulation übrigbleibende Gewebe war 100  $\mu$  dick und bestand aus der Submucosa und der basilar Mucosa. Dieses Transplantat wurde daraufhin in die infrarenale Aorta von 15 Hunden eingesetzt und erwies sich als beachtenswert erfolgreich.

Von den 15 Hunden behielten 13 ein durchgehend offenes Gefässtransplantat bis zum Zeitpunkt der Euthanasie. Bei elf Hunden erfolgte die Euthanasie nach verschiedenen Zeiten im Bereich von 4 Tagen bis 1 Jahr nach der Operation. Die Tiere zeigten keine Anzeichen von Infektionen, Aneurysmen- oder Thrombosenbildung im Gefässtransplantat. Der Funktionsverlust des Transplantats in zwei der Hunde wurde durch technische Fehler verursacht, einschliesslich falsches Platzieren der Metallklammern und ungenügender Anastomosis Technik. Zwei der Hunde waren Anfang Juli 1988 immer noch am Leben und wurden bezüglich der Langzeitdurchlässigkeit des Gefässtransplantats weiter beobachtet.

Die Durchlässigkeit der Gefässtransplantate wurde mittels positiver Kontrastradiographie innerhalb von vier bis sieben Tagen nach der Operation überprüft und nachher alle 6 bis 8 Wochen. Zusätzlich wurde die Durchlässigkeit klinisch überprüft durch die Beobachtung eines starken femoralen Pulses und durch die Abwesenheit von Ödemen an den Extremitäten.

Elf der Hunde mit anhaltender Durchlässigkeit der Gefässtransplantate wurden nach verschiedenen Zeitintervallen nach der Operation geopfert (4, 7, 10 und 14 Tage, und 9, 11, 13, 17, 26, 44 und 52 Wochen). Kurz vor der Euthanasie wurde die Durchlässigkeit des Transplantats mittels Angiographie bestätigt. Mit den erhaltenen Röntgenbildern konnten die Dilatation, Stenosis und Aneurysmenbildung der Gefässtransplantate vergleichend evaluiert werden. Alle elf Tiere wiesen eine vollständige Gefässdurchlässigkeit auf mit keinerlei Hinweisen auf schädliche Änderungen im Gefässvolumen.

Eine pathologische Grobevaluation der Transplantatsegmente zeigte schlimmernde luminalen Oberflächen mit wahllos angeordneten roten und weissen Flächen und keine Hinweise auf sich bildende Thromben. Ein dichtes Bindegewebe akkumulierte im engen Kontakt mit der Wand des Transplantats. Alle innerhalb von sechs Monaten nach der Operation untersuchten Proben zeigten kein Endothelzellenwachstum auf der Oberfläche des Transplantats. Die Oberflächen dieser Transplantate waren be-

deckt mit einer flachen, mittelmässig dichten und organisierten Kollagenschicht.

Histopathologische Untersuchungen der 26, 44 und 52 Wochen Proben zeigten eine flache, endothelartige Zelle, welche eine dünne Schicht (etwa 500  $\mu$ ) von dicht organisiertem Fibrin teilweise bedeckt. Das gesamte Gewebe war mit blutgefüllten Kapillaren durchsetzt und der äussere Rand des ursprünglichen Transplantats konnte vom umgebenden Bindegewebe nicht mehr unterschieden werden. Untersuchungen der luminalen Oberfläche mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigten eine Schicht von flachen Zellen mit ausgestreckten «Pseudopodien», die sich von Endothelzellen nicht unterscheiden liessen. Auch transmlslonselektronenmikroskopische Untersuchungen wiesen ebenfalls auf eine Endothelzelle hin, welche die Lumenoberfläche bedeckt. Zusätzlich konnte mittels Immunofluoreszenz-Färbung die Gegenwart von Faktor VIII: Verwandtem Antigen nachgewiesen werden, was ebenfalls auf den endothelialen Ursprung der Zellen auf der Lumenoberfläche des Transplantats hinweist. Im weiteren wurde die Gegenwart von Endothelzellen auch über den Nachweis des «Endothelium derived relaxing factor» getestet. Dazu wurde Acetylcholin auf die Oberfläche der Transplantat-Proben appliziert und der Ausfluss gesammelt. Dieser hatte die Eigenschaft, Zellen der glatten Muskulatur in der Aorta der Ratte zu entspannen, was auf die Gegenwart des «endothelium derived relaxing factors» hinweist.

Der Blutdruck wurde in jedem der 10 euthanasierten Hunde cephal, distal und innerhalb des SIS-Transplantats gemessen. An allen 3 Positionen wurde der selbe Wert in jedem der Hunde bestimmt, was auf keine normwidrigen hämodynamischen Effekte durch das SIS-Material hinweist.

In allen Hunden wurden die folgenden Laborparameter vor und einen Tage nach der Operation gemessen wie auch zu späteren Zeiten während den anschliessenden Monaten: Hämatokrit, Prothrombinzeit, aktivierte partielle Thromboplastinzeit, Plättchenzahl, vollständige Blutzählung und ein abgekürztes chemisches Serumprofil. Die Resultate zeigten für alle Tiere während allen Zeiten ein normales Bild. Den Tieren wurde während der Operation niedrige Heparin-Dosen verabreicht (600 units IV), ohne in der postoperativen Phase antikoaguliert zu werden. Das Fehlen jeglicher Änderungen im Koagulationstest und in der Plättchenzahl war dabei besonders ermutigend, besonders auch im Licht des im Vergleich zum Menschen hyperaktiven Koagulationssystems des Hundes.

#### Beispiel 2:

#### Die Dünndarm-Submucosa als ein arterielles Transplantat mit kleinem Durchmesser.

In diesem Experiment wurden 18 Hunden total 36 Gefässtransplantate in die Arteria carotis und die Arteria femoralis eingesetzt. 33 der 36 Gefässtransplantate blieben durchlässig. Laboruntersuchungen, identisch wie im ersten Beispiel, wurden mit allen Tieren durchgeführt und keine Abnormitä-

ten beobachtet. Zusätzlich wurde mittels zweidimensionaler Ultraschallbildgebung die Durchlässigkeit und der Gefässdurchmesser bestimmt.

Pathologische Untersuchungen des Transplantatgewebes eines euthanasierten Hundes 4 Tage nach erfolgter Operation zeigte eine nicht-thrombische luminale Oberfläche und eine leicht stenotische proximale Anastomosis. Histologische Prüfungen wiesen die frühe Bildung von blutgefüllten Kapillaren innerhalb der Gefässwand des Transplantats nach – ein natürliches potientes Abwehrsystem des Körpers gegen Infektionen. Fünf der Hunde waren Anfang Juli 1988 noch am Leben und wurden weiter untersucht. Der am längsten überlebende Hund war damals im 7. Monat nach der Operation.

#### Beispiel 3:

##### Die Dünndarm-Submucosa als ein venöses Transplantat.

In diesem Experiment wurden bei zwei Hunden je ein SIS-Transplantat in die Vena cava posterior (analog zur Vena cava inferior im Menschen) und bei fünf Hunden in die Vena cava anterior (analog zur Vena cava superior im Menschen) implantiert. Obwohl die Transplantate in der Vena cava posterior für nur 11 bzw. 14 Tage durchlässig blieben, zeigten pathologische Untersuchungen, dass technische Fehler dafür verantwortlich waren, die zu einer stenotischen inferioren Anastomosis-Stelle führten (Durchmesser 8 mm im Vergleich zu 16 mm der angrenzenden Vena cava und dem proximalen Transplantat). Die luminale Oberfläche der beiden Transplantate waren bedeckt mit einem nicht-thrombischen «Pseudoendothelium», welches aus dicht gepacktem Fibrin und unreifem kollagenen Bindegewebe aufgebaut ist.

Das Transplantat in der Vena cava anterior blieb durchlässig bis zur Euthanasie von drei Hunden 7, 14 bzw. 21 Tage nach der Operation. Zwei der Hunde waren Anfang Juli 1988 immer noch am Leben mit durchlässigen Gefäßstransplantaten, 7 Wochen nach der Operation. Die proximale Naht zeigte in allen drei Hunden Hinweise einer frühen Thrombosis, wobei eine Lasche des Transplantats invertierte und dadurch einen turbulenten Blutfluss verursachte; der Rest des Transplantats blieb aber nicht-thrombisch. Zusätzliche pathologische und histologische Untersuchungen zeigten, dass das Transplantat mit einer schimmernden, glatt-roten Oberfläche überzogen war, ähnlich wie in jungen Transplantaten von früheren Experimenten.

#### Beispiel 4:

##### Die Dünndarm-Submucosa als ein arterielles Allo-Transplantat.

SIS wurde als ein Allo-Transplantat mit grossem Durchmesser in der Aorta des Hundes eingesetzt. Die Allo-Transplantate wurden auf dieselbe Art und Weise hergestellt wie die oben in unseren Studien beschriebenen arteriellen Auto-Transplantate. An-

fang Juli 1988 befanden sich die Testtiere erst 8 Wochen nach der Operation und die Transplantate zeigten keine Anzeichen einer Thrombosen- oder Aneurysmen-Bildung, noch einer Infektion (Angiogrammkontrolle).

#### Beispiel 5:

##### Die Dünndarm-Submucosa als ein arterielles Hetero-Transplantat.

SIS wurde als Hetero-Transplantat im Hund eingesetzt. Dazu wurde ein SIS-Transplantat aus einer Katze gemäss den hier vorgehend beschriebenen Methoden präpariert und in einen Hund implantiert. Anfang Juli 1988 befand sich der Hund zwei Wochen nach der Operation und zeigte keine Krankheitszeichen.

#### Patentansprüche

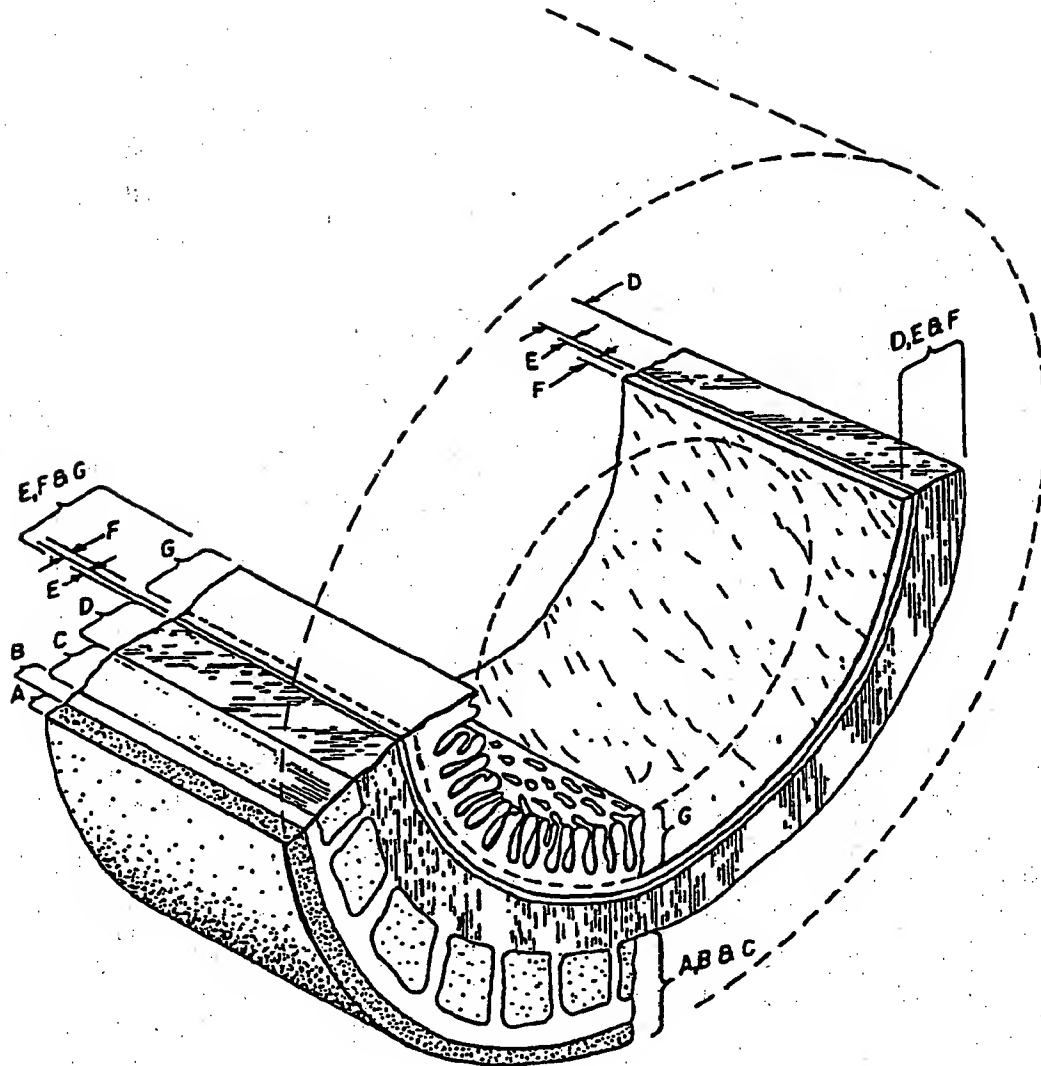
1. Gewebetransplantat enthaltend die Tunica submucosa eines Dünndarmgewebesegments, wobei die Tunica submucosa von der Tunica muscularis und mindestens dem luminalen Teil der Tunica mucosa des genannten intestinalen Gewebes abgelöst ist.

2. Gewebetransplantat gemäss Anspruch 1, zusammengesetzt aus der Tunica submucosa, der Mucosa muscularis und dem Stratum compactum der Tunica mucosa eines Dünndarmgewebesegments von einem warmblütigen Vertebraten, wobei die genannte Tunica submucosa, Mucosa muscularis und das Stratum compactum von der Tunica muscularis und dem luminalen Teil der Tunica mucosa des genannten intestinalen Gewebes abgelöst sind.

3. Gewebetransplantat nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Dünndarmgewebesegment ein Segment des Jejunum ist.

4. Gewebetransplantat nach Anspruch 1 oder 2 in zylindrischer Form mit einem vorbestimmten Lumen-durchmesser und genäht entlang der Zylinderachse.

5. Gewebetransplantat nach Anspruch 4, wobei die Lumenoberfläche des Zylinders durch das Stratum compactum gebildet wird.



Figur 1

BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO**